

低地個体群における高山植物の維持機構と適応進化

平成29年度白滝ジオパーク研究助成報告書

北海道大学大学院環境科学院 和久井 彬実

研究の背景

日本を含む北半球中緯度地域の高山環境には、周北極の高緯度地域と共通した生物種が生育しており、これらは“氷期遺存種”と呼ばれている。これらの生物種は、過去の氷期に高緯度地域から中緯度地域に分布を広げ、間氷期に分布を縮小する際、高山帯など一部の冷涼な環境に取り残されたと考えられている¹。ある生物種にとって不適な環境下で局所的に維持されている生息可能な環境は“レフュージア（逃避地）”とよばれ、長期間の隔離による固有の遺伝構造や、局所環境に対する適応による固有の生態的特性が生じやすいことが知られている²。中緯度の高山帯は氷期遺存種の逃避地として機能しており、生物の進化と保全の観点から重要であると考えられている³。

日本に分布する氷期遺存種の代表例として、森林限界より高標高に生育する高山植物がある。一方、北海道においては、コケモモやイソツツジ、ガンコウランなど、一部の高山植物が森林限界より下の山地帯（標高300—900 m）の風穴地や峠、低地帯（標高0—100 m）の海岸草原や高層湿原にも小規模な個体群を形成している⁴。近年、北海道の遠軽地域で行われた研究では、高山に生育するコケモモと低標高の風穴地に生育するコケモモで遺伝子型が異なるという結果が報告されており、低標高の生育地もレフュージアとして機能している可能性が指摘されている⁵。

もしレフュージアであるとすれば、低標高の個体群は約1万年という長い期間維持されてきたことになるが、高山帯とは異なる環境かつ隔離された環境下で、これらの個体群がどのように維持されているかは殆ど未解明である。本研究では、道内の高山帯・山地帯・低地帯において、遺伝解析を用いてコケモモ個体群の遺伝的多様度、他殖率、



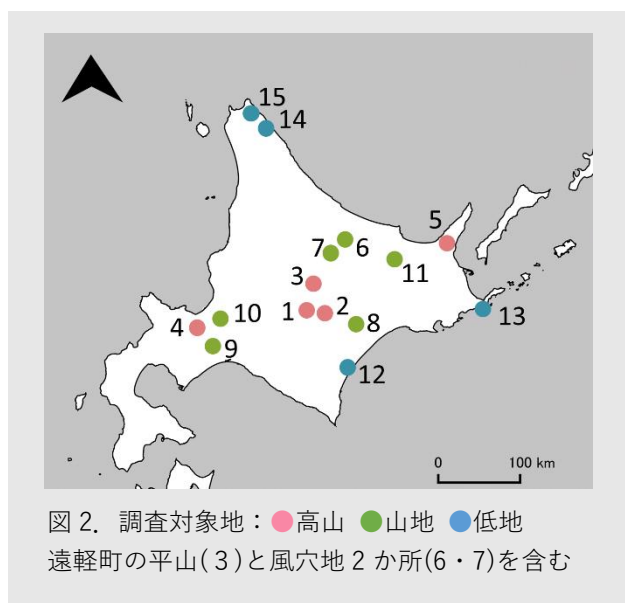
図1. コケモモ *Vaccinium vitis-idaea*
左上：花期6~7月，右上：結実期8~9月，
下：武利風穴の周囲に広がるコケモモの群落

個体群間の遺伝子流動および系統関係を調べるとともに、繁殖特性、形態特性の比較を行い、低標高に特異的な生態学的特性および遺伝学的特性を明らかにすることを目的とした。

研究方法

・対象種と調査地

本研究の対象種コケモモ (*Vaccinium vitis-idaea*) は、北半球に広く分布する周北極要素の植物であり、北海道においては高山、山地、低地の3タイプの環境に生育する（図1）。同種はツツジ科スノキ属の矮性低木で、種子生産の他に匍匐枝によるクローン成長を行い、個体群を維持する⁶。また、自殖由来の種子ができ難い、部分的自家不和合性であることが報告されている⁷。2016年~2017年に、北海道に分布する高山5地点、山地6地点、低地4地点の計15個体群（遠軽町の平山、風穴地2



地点を含む)を対象に、遺伝解析と野外調査を行った(図2)。各個体群に50m×25mの調査プロットを設置し、以降の調査や遺伝解析用サンプルの採取はこのプロット内で行った。

・遺伝解析

各個体群において25個のラメットからコケモモの葉と種子を採取し、近縁種ヒメツルコケモモで開発されたマイクロサテライトマーカー8種類⁸を用いて遺伝解析を行った。得られた結果から、各個体群の遺伝構造、遺伝的多様度、他殖率を算出した。また、各個体群の遺伝的な分化度をDAPC解析⁹を用いて調べた。コケモモは染色体数24本の2倍体種であるとされている⁶が、遺伝解析の波形から倍数性が疑われる個体群が存在したため、一部の個体群について、種子を発芽させ根端組織を酢酸ダーリアで染色し、染色体の観察を行った。

・繁殖特性・形態特性調査

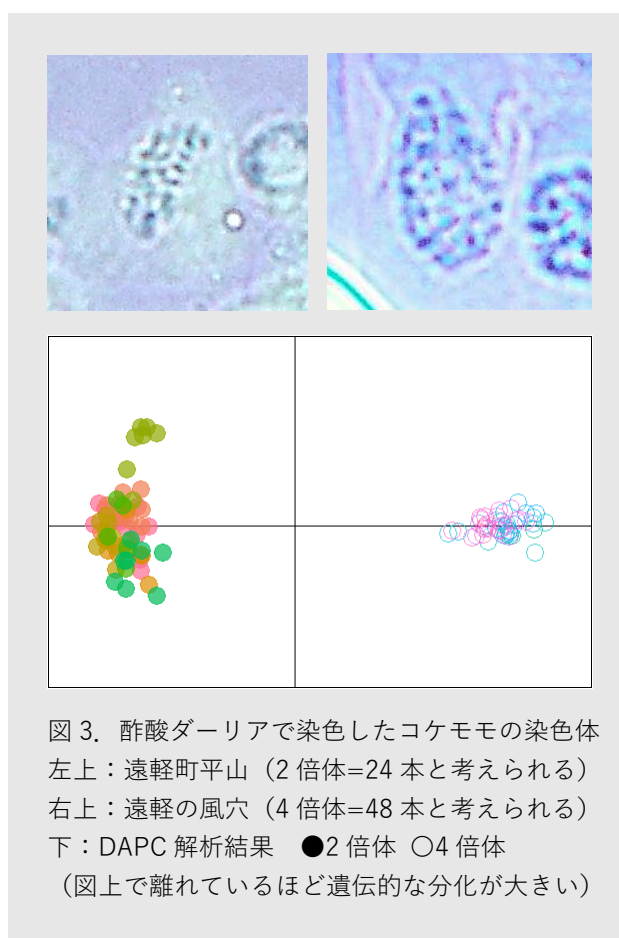
各個体群で50個の花序を標識し、花数と果実数から果実形成率を求めた。また、そのうち25個の果実をサンプリングし、果実当たりの種子数を記録した。また、自動自家受粉が起こるか(昆虫による花粉媒介がなくても自家受粉が起こるか)を調べる為に、8個体群において開花前の花序に袋掛けを行い、果実形成率と種子数を記録した。形態特性については、当年枝伸長量、花サイズ、葉面積、葉面積当たり重量(LMA)を測定した。得ら

れた結果は、一般化線形混合モデル(GLMM)を用いて比較を行った。

結果と考察

・北海道におけるコケモモの遺伝的分化

遺伝解析の結果から、北海道においては2倍体と4倍体のコケモモが存在する可能性が示唆された。2倍体と考えられる個体群7地点のうち2地点、4倍体と考えられる個体群8地点のうち2地点について実際に染色体観察を行った結果、図3のように実際の染色体数に違いがみられた。現段階では正確な染色体数を計数できておらず、また、全個体群について染色体観察を行ってはいないが、遺伝解析の波形と一部の染色体観察結果から、高山の個体群5地点と道東の低地個体群2地点は2倍体(染色体数 $2x=24$)、山地個体群6地点と道北の低地個体群2地点は4倍体(染色体数 $4x=48$)であると考えられる。即ち、低標高に分布する小規模な個体群のほとんどは、4倍体であると



推測された。遠軽町のコケモモについても、高山帯である平山個体群は2倍体、低標高の山地帯に分布する風穴2地点の個体群は4倍体である可能性が高い。北海道におけるコケモモの倍数性については、今後更なる実験を行い明らかにする予定である。

遺伝解析を行った全個体の遺伝子型をもとにDAPC解析を行い、散布図を描画した結果、2倍体と考えられる個体群と4倍体と考えられる個体群は、それぞれまとまったクラスターを形成しており、遺伝的にも異なることが示唆された(図3)。従って、低標高の中でも4倍体と考えられる8個体群は、高山帯の個体群とは異なる起源を有すると考えられ、北海道への侵入経路または侵入時期が異なる可能性が考えられる。

・個体群内の遺伝構造・遺伝的多様性

コケモモはクローン成長を行うため、同一個体が最大30mもの広範囲に広がることもある¹⁰。2倍体個体群、4倍体個体群で遺伝構造を比較した結果、2倍体個体群の多くは多数の個体が入り組

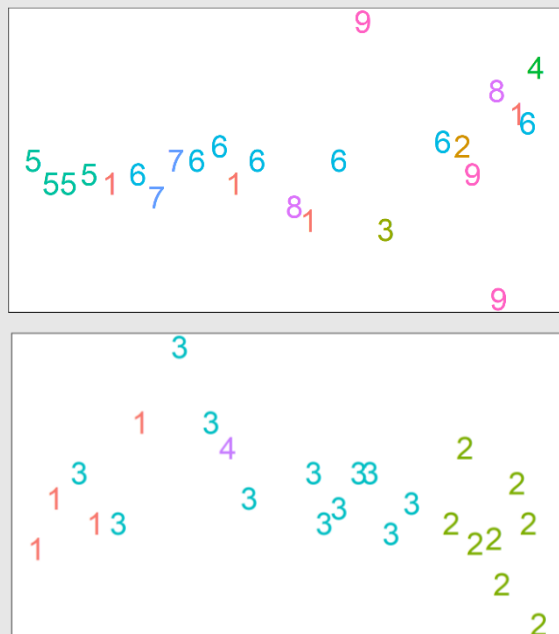


図4. コケモモ個体群の遺伝構造(約50m)
同一個体のクローンは同じ番号で表示
上: 遠軽町平山(2倍体と考えられる個体群)
下: 遠軽の風穴(4倍体と考えられる個体群)

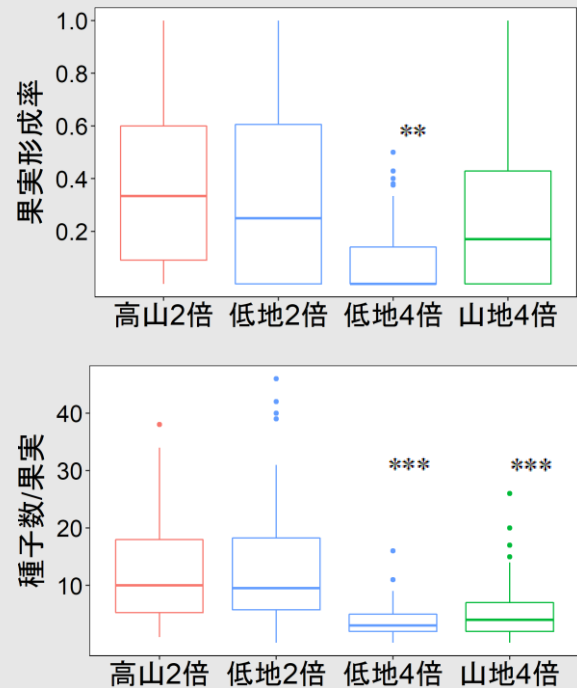


図5. GLMMによる繁殖特性の比較結果
上: 果実形成率, 下: 果実当たり種子数
(誤差構造: 負の二項/ポワソン分布, 有意差の有無はP値で判定: * 0.05 ** 0.01 *** 0.001)

んだ構造をしていた。一方で、4倍体個体群では少数の個体が広範囲に広がる構造が多くみられた(図4)。対立遺伝子の多様度、ヘテロ接合度(異なる対立遺伝子同士の組み合わせの割合)は、4倍体個体群で有意に高かった(P 値 <0.05)。即ち、4倍体個体群は、少数個体のクローンが個体群を構成しているにも関わらず、対立遺伝子レベルで見た多様度は2倍体よりも高い傾向がある。これは、染色体倍加によって遺伝子座当たりの対立遺伝子数も倍になったことの影響と考えられる¹¹。

・交配システムと繁殖機構

遺伝解析により各個体群の他殖率を求めたところ、4倍体個体群の他殖率が有意に低く(P 値 <0.05)、自殖由来の種子が多く生産されていた。コケモモは従来自殖種子ができ難い種とされているが、4倍体個体群に関しては、高い自家和合性を有していると考えられる。4倍体個体群では同一個体のクローンが広範囲に分布しているため、隣花受粉が起りやすい。更に、4倍体個体群は

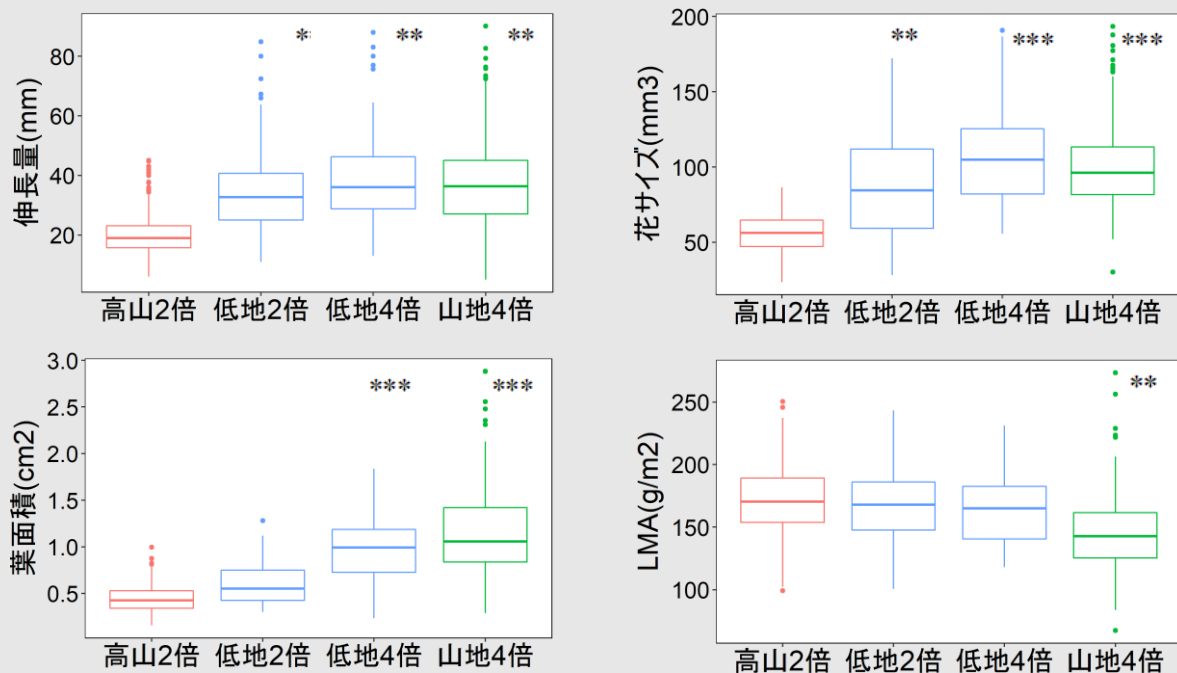


図 6. GLMM による形態特性の比較結果

左上：当年枝伸長量，右上：花サイズ，左下：葉面積，右下：葉面積当たり重量（LMA）

（誤差構造：ガンマ分布，有意差の有無は P 値で判定：* 0.05 **0.01 *** 0.001）

対立遺伝子の多様度およびヘテロ接合度が高くなっていったため、近交弱勢の原因となる有害遺伝子のホモ接合が生じ難いと考えられる。これによって、隣家受粉の起こりやすい環境下での自殖種子生産が可能になっている可能性がある。

野外における繁殖特性調査の結果を比較すると、自然状態での果実形成率と果実当たりの種子数は、2 倍体個体群よりも 4 倍体個体群で少ない傾向がみられた（図 5）。袋掛けを行った全個体群で若干の種子生産が見られたが、いずれも数は少なく、生育地・倍数性間での有意差はみられなかった。このことから、自動自家受粉による種子生産は個体群の維持には大きく貢献していないと考えられ、4 倍体個体群で多く生産されていた自殖由来種子は隣家受粉による副産物と考えられる。4 倍体個体群の維持には、隣家受粉などによる種子生産に加えてクローン成長が貢献していると考えられる。

・形態特性の変異

今回測定した全ての形態特性について、高山個体

群よりも低標高（山地、低地）個体群、2 倍体よりも 4 倍体の方が大型の形質を有する傾向がみられた（図 6）。これは、低標高では高山帯に比べて気温が高く生育期間が長いことと、染色体倍加による個体サイズの大型化¹²が複合的に関与した結果であると考えられる。また、山地帯では特に葉面積が大きく LMA が小さい、即ち大きくて薄い葉を持つ傾向が示された。森林の広がる山地帯では、暗い光環境に対する可塑的な応答として、葉が大きく薄くなった可能性も考えられる¹³。

まとめ・今後の展望

本研究で得られた結果から、北海道の風穴地や海岸など低標高の局所環境に生育するコケモモの多くが、高山に生育するコケモモとは異なる遺伝的特性および生態的特性を有することが明らかになった。また、更なる検証が必要ではあるが、低標高個体群の多くが、4 倍体のコケモモ個体群である可能性が示唆された。従って、北海道の低標高

に分布する小規模な個体群は、氷期遺存種の進化と多様性保全の観点から、非常に興味深く重要な個体群であると考えられる。今後は調査・解析の範囲を広げることにより、2 タイプのコケモモの過去の分布変遷や進化の経路を明らかにすることが必要である。

参考文献

1. Hewitt, G. M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **359**, 183–195; discussion 195 (2004).
2. Mee, J. a. & Moore, J.-S. The ecological and evolutionary implications of microrefugia. *J. Biogeogr.* **41**, 837–841 (2014).
3. Ikeda, H., Senni, K., Fujii, N. & Setoguchi, H. Survival and genetic divergence of an arctic-alpine plant, *Diapensia lapponica* subsp. *obovata* (Fr. Schm.) Hult??n (Diapensiaceae), in the high mountains of central Japan during climatic oscillations. *Plant Syst. Evol.* **272**, 197–210 (2008).
4. Sato, K. An outline of the cool-spot site vegetation in the Alps, Central Europe. *Bull. Hiroshima Univ. Econ.* **30**, 5–46 (2008).
5. Shimokawabe, A., Yamaura, Y., Sueyoshi, M., Kudo, G. & Nakamura, F. Genetic structure of *Vaccinium vitis-idaea* in lowland cool spot and alpine populations: microrefugia of alpine plants in the midlatitudes. *Alp. Bot.* **126**, 143–151 (2016).
6. Ritchie, J. C. *Vaccinium Vitis-Idaea* L. *J. Ecol.* **43**, 701–708 (1955).
7. Guillaume, P. & Jacquemart, A. Early-inbreeding depression in *Vaccinium myrtillus* and *V. vitis-idaea*. *Protoplasma* **208**, 107–114 (1999).
8. Zhu, H. *et al.* Mining and validation of pyrosequenced simple sequence repeats (SSRs) from American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). *Theor. Appl. Genet.* **124**, 87–96 (2012).
9. Jombart, T. ADEGENET: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* **24**, 1403–1405 (2008).
10. Persson, H. A. & Gustavsson, B. A. The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf-shape analysis. *Mol. Ecol.* **10**, 1385–1397 (2001).
11. Soltis, D. E., Soltis, P. S. & Tate, J. A. Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytol.* **161**, 173–191 (2004).
12. Otto, S. P. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. *Cell* **131**, 452–462 (2007).
13. Poorter, H. *et al.* Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytol.* **182**, 565–588 (2009).